 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.06.19 J South Med Univ, 2016, 36(6): 838-841

基础研究

蜂毒对胶原诱导性关节炎炎性痛大鼠背根神经节TrkA、TRPV1的影响

冼培凤,陈 莹,杨 路,刘国涛,彭 澎,王升旭
南方医科大学中医药学院针推教研室,广东 广州 510515

摘要:目的 探讨蜂毒对胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠TrkA、TRPV1疼痛信号分子的影响。**方法** 分为正常对照组、模型组、蜂毒组(BV, 3 mg/mL)。采用Wistar雄性成年大鼠,Collagen Ⅱ+IFA 0.2 mL造模。BV组于造模14 d后开始给药,直至21 d;记录每组足跖厚度、痛阈和肿胀关节评分,背根神经节采用IHC观察病理切片TRPV1的表达和western boltting观察TrkA的表达,评价蜂毒对CIA大鼠踝关节的干预。**结果** 造模从10 d起开始肿胀,14 d内全部出现CIA体征,足跖厚度和肿胀关节评分整体上呈逐渐增加的趋势。在14 d时趋于平稳。BV组予蜂毒0.3 mg治疗7 d,BV组足跖厚度和肿胀关节评分低于模型组。痛阈(秒):正常对照组15.47±0.35,模型组10.90±0.10,BV组13.14±0.18。免疫组化TRPV1阳性细胞百分数(%):正常对照组11.40±1.48,模型组44.47±4.38,BV组21.60±2.20。western blotting 观察TrkA表达(灰度值):正常对照组1.59±0.04,模型组4.53±0.21,BV组2.46±0.17。**结论** 蜂毒注射能降低炎性痛大鼠DRG信号分子TrkA、TRPV1的表达水平。这可能是消炎镇痛的信号通路之一,为蜂毒治疗类风湿性关节炎提供新的启发。
关键词:蜂毒;辣椒素受体;络氨酸激酶A;类风湿关节炎;胶原诱导性关节炎

Effect of bee venom injection on TrkA and TRPV1 expression in the dorsal root ganglion of rats with collagen-induced arthritis

XIAN Peifeng, CHEN Ying, YANG Lu, LIU Guotao, PENG Peng, WANG Shengxu
Department of Acupuncture and Moxibustion, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of acupoint injection of bee venom on collagen-induced arthritis (CIA) in rats and explore the mechanism of bee venom therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Methods** Fifteen male Wistar rats were randomly divided into bee venom treatment group (BV group), CIA model group, and control group. In the former two groups, CIA was induced by injections of collagen Ⅱ+IFA (0.2 mL) via the tail vein, and in the control group, normal saline was injected instead. The rats in BV group received daily injection of 0.1 mL (3 mg/mL) bee venom for 7 consecutive days. All the rats were assessed for paw thickness and arthritis index from days 14 to 21, and the pain threshold was determined on day 21. The expressions of TRPV1 and TrkA in the dorsal root ganglion at the level of L4-6 were detected using immunohistochemistry and Western blotting, respectively. **Results** The rats in CIA model group started to show paw swelling on day 10, and by day 14, all the rats in this group showed typical signs of CIA. In BV group, the rats receiving been venom therapy for 7 days showed a significantly smaller paw thickness and a low arthritis index than those in the model group. The pain threshold was the highest in the control group and the lowest in the model group. TRPV1-positive cells and TrkA expression in the dorsal root ganglion was significantly reduced in BV group as compared with that in the model group. **Conclusions** Injection of bee venom can decrease expression of TRPV1 and TrkA in the dorsal root ganglion to produce anti-inflammatory and analgesic effects, suggesting the potential value of bee venom in the treatment of rheumatoid arthritis.
Key words: bee venom; TRPV1; TrkA; rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)引起的炎性痛[1]是目前临床工作中最为常见的病理性疼痛之一,有病程长久、迁延反复和耗费巨大的特点。目前RA炎性痛治疗仍没有十分有效的方法,临床用药各有特点。他汀类药物可使多种蛋白难以进行异戊二烯化修饰,抑制炎症[2]。辣椒素受体(TRPV1)拮抗剂作为新型镇痛药正在被开发,但部分拮抗剂因体温过高的不良反应致研究中止[3]。有研究[4-6]提出可通过抑制络氨酸激酶A(TrkA)表达可减轻痛觉过敏,TrkA拮抗剂作为新型镇痛药正被广泛研究,有望用于临床。TrkA、TRPV1是炎性痛产生维持过程中的重要信号分子[4-9]。蜂毒干粉含蜂毒肽、蜂毒明肽等多种生物活性物质对治疗RA及炎性痛有

收稿日期:2016-03-03
基金项目:国家自然科学基金优秀青年科学基金(81303047)
Supported by Natural Science Foundation for the Youth (NSFY) of China (81303047).
作者简介:冼培凤,在读硕士研究生,E-mail: xianpeifeng@163.com
通信作者:王升旭,博士研究生,教授,电话:020-61648771,E-mail: sxwang88@126.com

效[10-12]，但关于蜂毒对炎性痛TRPV1的调控作用机制的报道研究较少，目前还没有蜂毒消炎镇痛与TrkA、TRPV1关系的研究。本实验研究采用CIA大鼠造模，治疗采用蜂毒干预，观察双侧足跖厚度、肿胀关节评分和痛阈变化，初步验证蜂毒治疗RA炎性痛的有效性，探讨蜂毒对胶原诱导性关节炎（CIA）大鼠的治疗作用及其可能的作用机制，并采用免疫组化观察背根神经节TRPV1表达、western blotting检测TrkA含量，初步探讨TrkA、TRPV1与炎性痛的相关性。这不仅有利于蜂毒的规范使用，还为开发新作用靶点消炎镇痛药物提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年雄性Wistar大鼠15只，体质量180~220 g，购于南方医科大学动物中心。

1.2 材料和仪器

小牛Ⅱ型胶原（chondrex公司），不完全弗氏佐剂（IFA）、蜂毒（BV）（Sigma-Aldrich公司）。TRPV1、TrkA试剂盒（abcam公司）。数显卡尺（Forgestar公司）。life science model 390 热痛测试仪（美国IITC公司）。其余材料由南方医科大学试剂中心提供。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的建立和分组 SPF级实验室自由饲养4 d。随机分为正常对照组、模型组、BV组，每组5只。

实验前1 d(d0)将小牛Ⅱ型胶原试剂（10 mg装）存于4 ℃过夜。实验第1天时于无菌条件下将其与IFA在等体积冰浴中混合充分乳化。检测时抽取一滴乳化剂滴入盛水烧杯中，均匀铺开为准。4 ℃冰箱保存备用。实验第1天（d1）时模型组和BV组大鼠于尾根部注射小牛Ⅱ型胶原和IFA的乳化剂0.2 mL初次免疫，正常对照组于尾根部注射生理盐水0.2 mL。d8时模型组和BV组再次注射乳化剂0.2 mL加强免疫，正常对照组再次注射生理盐水0.2 mL。从d10起每日造模大鼠足跖肿胀者逐渐增多，活动减少，行走拖步。14 d内造模大鼠均出现CIA体征，足跖厚度不同程度肿胀，且肿胀未见明显消退，均可进行下一步实验。

1.3.2 实验方法 （1）足跖厚度：连续7 d采用数显卡尺，以大鼠足跖底正中面与足掌关节掌骨正中矢状面为轴，双下肢各测量3次，求和取平均值；（2）肿胀关节评分（AI）：连续7 d，按AI评分标准对大鼠四肢的各个关节的积分累计求和，即为每只鼠的AI。AI评分标准：0分，无红肿；1分，小趾关节轻度红肿；2分，小趾关节和足跖肿胀；3分，踝关节以下的足爪肿胀；4分，包括踝关节在内的全部足爪、关节肿胀；（3）痛阈：在最后1 d进行测量。设RI=35，上限为20 s，将热痛测试仪热辐射光源焦点对准大鼠下肢足跖底正中皮肤，每只大鼠双下肢各测量2次，每次间隔10 min，求和取平均值。

1.3.3 治疗 BV组治疗首先固定大鼠使其无法自由转动，用蒸馏水和蜂毒干粉配制3 mg/mL的蜂毒溶液，用1 mL注射器抽取，从d15起于大鼠单侧足三里穴注射0.1 mL。1次/d，连续治疗7 d。取穴参照《实验针灸学》定位法。模型组注射生理盐水，方法、穴位、剂量和疗程同BV组。正常对照组不干预。

1.3.4 免疫组化检测DRG内TRPV1含量变化 干预结束后戊巴比妥钠腹腔麻醉，剪开膈肌、胸壁，暴露心脏；经左心室行主动脉插管，左手固定心脏，右手持针从心尖搏动处插入左心室、主动脉弓，先生理盐水快冲，右心耳泛白剪开右心耳，后用4%多聚甲醛灌注先快后慢固定。固定后取腰段脊柱，沿坐骨神经逆行追踪L4-6神经至椎间孔，轻用力将DRG从椎间孔取出。标本常规脱水，石蜡包埋，切片厚4 μm。常规脱蜡至水，室温孵育，PBS冲洗，热修复，封闭，滴加1∶100稀释TRPV1一抗（abcam），4 ℃过夜。冲洗，二抗标记，孵育，漂洗等，显色，冲洗，复染，脱水，封固，置目镜（×200）测微尺下观察阳性细胞计数。

1.3.5 Western blotting检测DRG中TrkA的含量改变 标本DRG（L4-6）取材步骤同免疫组化。称质量后研碎，裂解，离心，取上清液，蛋白浓度测定等。清洗玻片，制胶，上样，电泳跑胶，转膜，封闭，按1∶5000稀释TrkA一抗（abcam）、二抗依次孵育过夜并洗3次，最后显色，曝光，扫描图片，用Quantity One软件对Western blotting条带进行灰度分析，记录其灰度值。蛋白质的相对含量用目的蛋白与内参条带光密度的比值表示，按计量资料进行统计分析。

1.4 数据处理及统计方法

采用t检验、ANOVA等进行比较，结果以均数±标准差形式表达，$P<0.05$表示差异有统计学意义（SPSS17.0）。

2 结果

2.1 足跖厚度

与正常对照组相比（表1），CIA大鼠足跖厚度明显增加，模型组在NS注射7 d后足跖厚度变化不明显；BV组在给予BV治疗3 d内与模型组相比足跖厚度下降不明显，治疗4、5 d后下降明显（$P<0.05$），治疗6、7 d后厚度降至与正常对照组相似（$P<0.05$）。BV组差值与模型组、正常对照组有明显差异（$P<0.05$），模型组和正常对照组差值无明显差别（$P>0.05$）。

2.2 肿胀关节评分AI

BV组给予BV治疗3 d后与模型组相比AI评分无明显差别（$P>0.05$）；在治疗4~7 d间AI降低明显，与模

表1 各组大鼠双下肢足跖厚度的变化

Tab.1 Changes of the rats' hind paw thickness（*Mean*±*SD*, mm）

Group	d15	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22	DIF
CN	6.29±0.28	6.33±0.30	6.34±0.32	6.41±0.30	6.41±0.29	6.45±0.25	6.48±0.22	6.53±0.21	0.24±0.07
M	10.36±1.86#	10.87±2.49#	10.94±2.46#	10.87±2.42#	10.89±2.46#	10.84±2.47#	10.82±2.47#	10.76±2.43#	0.40±0.78##
BV	10.30±1.48*#	10.12±1.34*#	9.53±1.37*#	9.40±1.22*#	8.75±0.83**#	8.61±0.78**#	7.74±0.63**##	7.45±0.63**##	-2.85±0.96**#

CN: Control group; M: Model group; BV: Bee Venom group; DIF: Difference. **P*>0.05 *vs* M group; ***P*<0.05 *vs* M group; #*P*<0.05 *vs* CN group; ##*P*>0.05.

型组有显著差异(P<0.05)；正常对照组大鼠不造模未见肿胀，与CIA大鼠有明显差别(表2)。

2.3 各组大鼠痛阈、DRG内TRPV1和TrkA含量比较

模型组和BV组痛阈明显低于正常对照组，BV组痛阈高于模型组(P<0.05)；模型组、BV组TRPV1阳性细胞百分数、TrkA含量显著高于正常对照组(P<0.05)，BV组TRPV1阳性细胞数、TrkA含量低于模型组(P<0.05，表3、图1)。

表2 各组大鼠四肢肿胀关节评分的变化

Tab.2 Changes of the rats' AI（*Mean*±*SD*, score）

Group	d15	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22	DIF
M	8.6±1.95	9.2±2.59	9.2±2.59	9.4±2.41	9.0±2.92	8.8±2.68	8.8±2.68	8.4±2.70	-0.2±0.84
BV	8.8±1.30*	8.8±1.30*	8.2±1.30*	8.0±1.58*	7.2±1.30*	6.20±1.30**	6.0±1.41**	5.2±0.84**	-3.6±0.55**

AI: Arthritis Index. **P*>0.05 *vs* M group; ***P*<0.05 *vs* M group.

表3 各组大鼠DRG内TRPV1阳性细胞百分数和TrkA含量

Tab.3 Pain thresholds and percent of TRPV1 positive cells and expression of TrkA (*Mean*±*SD*, *n*=5)

Group	Pain thresholds	Percent of TRPV1	Expression of TrkA
CN	15.44±0.25	11.42±1.28	1.60±0.07
M	10.87±0.21#	44.53±4.00#	4.53±0.20#
BV	13.15±0.18**#	21.60±2.08**#	2.46±0.15**#

***P*<0.05 *vs* M group; #*P*<0.05 *vs* CN group.

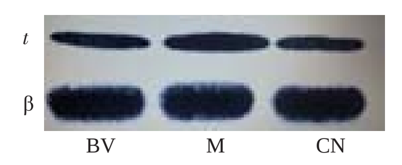


图1 不同组大鼠背根神经节中TrkA、β-actin蛋白的表达

Fig.1 Expressions in TrkA and β-actin protein in the dorsal root ganglion of rats in different groups.t: TrkA; β: β-actin; CN: Control group; M: Model group; BV: Bee Venom group.

3 讨论

类风湿关节炎引起的炎性痛[1]是严重影响人们生活工作的常见病理性疼痛。TRPV1拮抗剂可治疗疼痛，TrkA也被用于新型镇痛药研究[13]。蜂毒能刺激垂体-肾上腺皮质，抑制炎症因子和前列腺素合成酶等的表达[10-12]，蜂毒对治疗RA有效[10-15]，但缺少蜂毒对炎性痛TRPV1的调控作用机制的报道研究。背根神经节(DRG)是伤害性刺激的传入通道，包含多种疼痛相关的受体、离子通道以及信号转导分子。

辣椒素受体TRPV1[7-9, 16-18]属热敏性、伤害性阳离子通道，主要在DRG、节状神经节和脑三叉神经节等分布；在IL1-β、IL15、TNF-α等促炎作用下PI3K、PKC和CaMKⅡ等磷酸化TRPV1的部分位点而呈致敏状态。TRPV1基因敲除小鼠注入CFA、角叉胶或TNF-α等后不再痛敏[9, 19]，证明TRPV1是炎性痛必不可少的疼痛刺激信号整合者。丝氨酸苏氨酸激酶[20]p38MAPK通过磷酸化和级联反应参与炎性痛，RA炎性痛大鼠p38MAPK水平升高，其抑制剂SBZO358O则减轻疼痛，证明它也是炎性痛中的重要分子[7, 21-22]。

TrkA是近年来消炎镇痛作用靶点研究的热门分子。它属于原癌基因酪氨酸蛋白激酶家族，是NGF的

高亲和力受体[4, 23]，NGF(TrkA)可通过两条途径[19]影响TRPV1：(1)创伤或炎症时配体NGF堆积，同时DRG表达受体TrkA，NGF与TrkA高度结合，激活PLC、PI3K等，从而降低TRPV1开放阈值；(2)局部产生NGF并沿外周神经逆行至DRG与TrkA结合，激活P38MAPK的转录和翻译，上调DRG内TRPV1表达，TRPV1再被运输到伤害感受器末梢，引起阳离子(Ca^{2+}为主)从胞外进入胞内，产生动作电位，通道开放，同时进一步释放更多的炎症因子NGF、5-HT、TNF-α、组胺等，降低痛阈，并投射到大脑皮层，产生疼痛。

本研究采用IHC-P观察DRG中TRPV1的阳性细胞百分数和western blotting检测TrkA含量。结果发现CIA炎性痛大鼠的足跖厚度和AI高于正常对照组、痛阈低于正常对照组；DRG中TRPV1阳性细胞百分数高于正常对照组，即炎性痛时DRG中TrkA、TRPV1的表达水平亦升高；提示TRPV1和TrkA共同参与了炎性痛的产生，两者存在正相关。因此，本研究认为炎性痛发生时TrkA、TRPV1水平上升，痛阈下降，TrkA与TRPV1是炎性痛产生时疼痛信号转导的重要分子。

结果还发现，CIA炎性痛大鼠在BV治疗后(BV组)足跖厚度和AI较模型组低，痛阈较模型组高；DRG中TRPV1阳性细胞百分数、TrkA含量BV组低于模型组，即蜂毒治疗炎性痛大鼠其DRG中TRPV1、TrkA的表达水平下降；提示蜂毒抑制炎性痛大鼠DRG中TrkA、TRPV1的表达水平。本研究初步认为蜂毒通过抑制炎性痛大鼠DRG中TrkA、TRPV1的表达水平，从而影响TRPV1对疼痛的调控作用。TrkA可能是TRPV1疼痛信号转导通路的重要分子。

本研究认为蜂毒能够抑制炎性痛大鼠DRG中TrkA、TRPV1的表达水平，从而减轻炎性痛。TrkA与TRPV1是疼痛信号转导的重要分子，两者的相关性可能是消炎镇痛的途径之一。NGF(TrkA)/MAPK(p38MAPK)/TRPV1可能是炎性痛产生和维持过程中的重要信号通路[4-9, 21-23]。研究的不足之处是尚未采用排除性试验方法证实蜂毒能够通过抑制TrkA的表达水平达到抑制TRPV1在疼痛信号转导中的调控作用，应进一步研究其中一种分子拮抗剂使用后另一种分子表达的变化，从而更全面证实TrkA与TRPV1在疼痛信号转导通路中的相互关系。这有利于蜂毒临床运用的规范化，并为开发新作用靶点的消炎镇痛药提供新的理论依据。

参考文献：

[1] 王吉波, 吕振华. 类风湿关节炎[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 13-27.
[2] 李永乐. 他汀类药物抗炎机制及其在神经病理性疼痛中的应用[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(9): 1001-3.
[3] 戴冬艳, 张惠斌, 钱 海, 等. 治疗疼痛新途径: 瞬时受体电位香草酸亚型1拮抗剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(01): 11-9.
[4] 程鸣佳, 林一丹. 神经生长因子-TrkA信号通路在疼痛中的作用机制及TrkA抑制剂的研究进展[J]. 创伤外科杂志, 2014, 16(5): 468-71.
[5] 邓小华, 罗学港. 神经生长因子受体TrkA在中枢神经系统的表达、分布和作用[J]. 国外医学. 神经病学神经外科学分册, 2000, 27(1): 52-5.
[6] 梅旭晖, 纪 倩, 吴剑聪, 等. 推拿对坐骨神经损伤大鼠神经生长因子及其受体TrkA的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(7): 497-500, 后插2.
[7] 衡立君, 高国栋, 陈 军. 辣椒素受体VR1在局部炎症状态下的敏化机制[J]. 神经解剖学杂志, 2004, 20(3): 315-8.
[8] 陈 敏, 张陆勇, 严 明. 辣椒素受体研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(2): 126-30.
[9] Palazzo E, Luongo L, De Novellis V, et al. Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development[J]. Curr Opin Pharmacol, 2012, 12(1): 9-17.
[10] 刘喜德, 张金禄, 郑汉光, 等. 蜂针疗法治疗类风湿关节炎的临床随机对照研究[J]. 针刺研究, 2008, 33(3): 197-200.
[11] 刘喜德, 张金禄, 郑汉光, 等. 蜂针疗法对类风湿关节炎患者外周血TNF-α IL-1β的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(5): 996-7.
[12] 周颖芳, 段颖华, 李万瑶. 蜂针对胶原诱导关节炎大鼠HPA轴的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(4): 233-5.
[13] 戴冬艳, 张惠斌, 钱 海, 等. 治疗疼痛新途径: 瞬时受体电位香草酸亚型1拮抗剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(1): 11-9.
[14] Lee JY, Kang SS, Kim JH, et al. Inhibitory effect of whole bee venom in adjuvant-induced arthritis[J]. *In Vivo*, 2005, 19(4): 801-5.
[15] Li MM, Yu YQ, Fu H, et al. Extracellular signal-regulated kinases mediate melittin-induced hypersensitivity of spinal neurons to chemical and thermal but not mechanical stimuli[J]. Brain Res Bull, 2008, 77(5): 227-32.
[16] 贾 岳, 洪炎国. 瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)与炎性痛[J]. 生命科学, 2010, 22(12): 1259-63.
[17] 鹿晓文, 寇 亮, 杜 莉. 瞬时受体电位香草酸亚型1介导疼痛及其调节机制[J]. 国际口腔医学杂志, 2014, 41(1): 82-7.
[18] 赵齐飞, 李 彬. 瞬时受体电位香草酸亚型1在炎症中的作用[J]. 中国当代医药, 2013, 20(33): 20-1.
[19] Khan AA, Diogenes A, Jeske NA, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin[J]. Neuroscience, 2008, 155(2): 503-9.
[20] 黄美娜. 电针对慢性吗啡耐受大鼠辣椒素受体磷酸化改变的影响及机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2011.
[21] Ji RR, Samad TA, Jin SX, et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia[J]. Neuron, 2002, 36(1): 57-68.
[22] 龚 伟, 王升旭. 电针夹脊穴在佐剂性关节炎大鼠镇痛过程中磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶的变化及作用[J]. 中国临床康复, 2004, 8(8): 1514-5.
[23] 尹方明. P75和TrKA: 两种NGF受体系[J]. 国外医学: 神经病学神经外科学分册, 1997, 24(4): 205-8.

(编辑：经 媛)